

課題番号 : F-14-UT-0086
 利用形態 : 機器利用
 利用課題名(日本語) : マイクロアレイチップ技術を用いた高速タンパク質進化システムの創製
 Program Title (English) : High-speed proteins evolution system using microarray chip technology
 利用者名(日本語) : 佐藤秀介、福田拓海、吉原彬文、ラジ クマール スバシニ、一木隆範
 Username (English) : S. Sato, T. Fukuda, A. Yoshihara, S. R. Kumal, T. Ichiki
 所属名(日本語) : 東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻
 Affiliation (English) : Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

1. 概要(Summary)

医療、バイオ燃料、バイオセンサーなどの高機能化にはタンパク質機能の飛躍的な向上が本質的な課題となっている。高機能タンパク質の取得法の中で、遺伝子の変異と機能の淘汰の繰り返しであるダーウィン進化論による生物の進化を、分子レベルで人為的に再現した進化分子工学による技術を利用して、機能性タンパク質の進化が可能である。しかし、膨大な多様性(メガ・ギガ規模の変異体)に対する淘汰には、アフィニティー機能の進化が限度である。そこで、アフィニティー以外の機能を有する機能性タンパク質を進化させるシステムを実現するため、大規模集積アレイをプラットフォームとした高効率スクリーニング戦略を提案した(Fig. 1)。

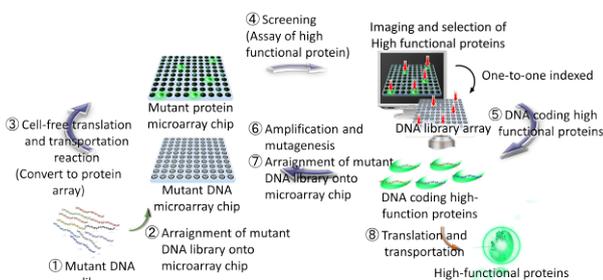


Fig. 1 Molecular evolution system on microarray chip.

2. 実験(Experimental)

・利用した主な装置: MA6 マスクアライナー

本研究は、タンパク質アレイに変換可能な高集積DNAアレイチップの作製方法を提案し、その有用性の実証を行った。ここで重要なことは、オンチップ合成でタンパク質アレイチップに変換が可能で、また、変異体数がメガ・ギガ規模で大規模並列化が可能で、さらに、DNAの回収に関する分子進化プロセスを考慮することである。従来のDNAチップには、分子進化ツールとしての構想はなかった。そこで、進化プロセスに適応した新たなDNAマイクロアレイチップを開発するため、逐次工程に依らない

DNAを固定した磁気ビーズ担体の自己整合によるランダムアレイ配置法を提案した。

まず、MA6 マスクアライナーを用いて、4 inch ウェハ上にピラー(ϕ 4 μ m, H = 4 μ m)を 25×10^6 パターンニングしたモールドを作製した。このモールドをシリコン(PDMS)に転写することでマイクロウェルアレイチップを作製した。次に予め用意した磁気ビーズに固定したDNAを磁場援用によりチップ上に配置した。

3. 結果と考察(Results and Discussion)

DNAの担体である磁気ビーズのサイズが ϕ 3 μ mであることから、1つのウェルに1つの磁気ビーズを配置可能なマイクロウェルを設計している。外部磁場を援用することでDNAを固定した磁気ビーズが自己整合し、マイクロウェルチップ上へ高い充填率(99.9%)でアレイ状にランダム配置した(Fig. 2)。結果、25メガの高集積DNAマイクロアレイチップの作製が可能であることを実証した。この成果は、従来のスポッターを用いる逐次工程では実質的に不可能であったメガ規模($>10^7$)の高集積DNAマイクロアレイチップの作製が可能であることを示している。

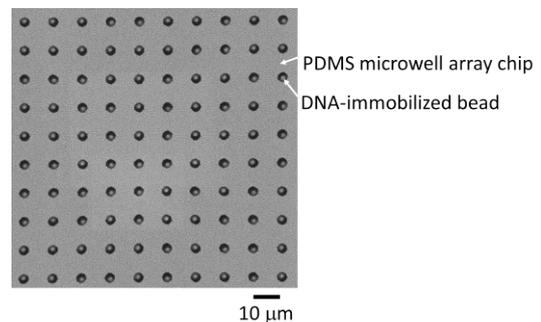


Fig. 2 SEM image of the microwell array chip filled with DNA-immobilized magnetic beads.

4. その他・特記事項(Others)

・ 参考文献

- A.Q.Emili *et al.*, Nat. Biotech. 18, (2000) 393
- D. Dressman *et al.*, PNAS 100 (2003) 8817